

## Process for the preparation of 3,11-alpha dihydroxy-1,3,5(10) estratriene derivatives.

Publication number: EP0114984 (A2)

Also published as:

Publication date: 1994-08-08

EP0114984 (A3)

Inventor(s): PETZOLDT KARL DR; NEEF GUNTER DR; EDER ULRICH DR

EP0114984 (B1)

Applicant(s): SCHERING AG [DE]

DE3248434 (A1)

Classification:

- international: C07J1/00; C07J21/00; C12P33/10; C12P33/16; C07J1/00;  
C07J21/00; C12P33/00; (IPC1-7): C12P33/10; C07J1/00;  
C12P33/16

Cited documents:

- European: C07J1/00B2; C07J1/00C5C2; C07J21/00C2; C12P33/10;  
C12P33/16

US3429779 (A)

DE1909152 (A1)

EP0028309 (A1)

Application number: EP19830112230 19831206

Priority number(s): DE1982324434 19821223

### Abstract of EP 0114984 (A2)

1. Process for the preparation of 3,11 alpha-dihydroxy-1,3,5(10)-oestratriene derivatives of the general formula I see diagramm : EP0114984,P4,F1 in which R represents an alkyl radical having a maximum of 4 carbon atoms, characterized in that a 3-oxo-4-oestrene derivative of the general formula II see diagramm : EP0114984,P4,F2 in which R has the meaning mentioned above and X and Y together represent an oxo group or X represents a hydroxy group and Y represents a hydrogen atom, is fermented with a culture of *Aspergillus ochraceus* and, when hydroxylation is complete, with a culture of *Arthrobacter simplex* or *Bacillus sphaericus*.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

**Result Page**

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

The invention relates to the claims gekenn drawn methods and the use of the procedure products obtained thereby.

3,11a-Dihydroxy-1,3,5 (10) - östratrien derivatives of the general formula I according to claim 1 are important intermediates to the Partialsynthese of pharmacological effective steroids.

It is known that steroids with aromatic A-ring are little suitable as substrates for microbiological conversions (K.Kieslich, steroid Conversions, in R.H. Rose Microbiol. Bioconversions, Academic press 1981, 425). At 3-Oxo-#4 or 3-Hydroxy-E - steroiden in high yields feasible Ila hydroxylation (W. Carney and H.L. Duke, Microbial transformation OF of steroid, Academic do not press 1967) is more transferable on estrone and estradiol. One receives the Ila hydroxy compounds of the Ö^stradiols and its 18-Alkylhomologen to surprising derweile with the help of the invention process in high yields.

The first reaction step of the invention process becomes the bottom conditions performed, which one travels more conventional with the microbiological hydroxylation of steroids along fungus cultures uses. Thus first the most favorable fermentation conditions, like the example selection of the most favorable nutrient medium, become the suitable substrate solution or suspending agent, the substrate concentration, the technical conditions such as temperature, aeration, pH value and the optimum times for Germination, substrate addition and substrate contact at the enzyme of the microorganism analytic, in particular thin section-chromatographic, determined in general conventional preliminary tests.

Shown that it is convenient one has itself, to use concentrations of approximately 100 - 2,000 mg substrate per liter nutrient medium. The pH value preferably becomes on a value within the range of 5 - 7 adjusted. The breeding temperature lies within the range of 20 - 40 C, preferably of 25,350 C. The aeration becomes preferably 0.5 to 5 liters air per minute per liter culture broth supplied. The conversion of the substrate becomes appropriately followed by thin section-chromatographic analysis of sample excerpts.

The fermentation duration amounts to about 20 to 80 hours.

The aspergillus needed for this first reaction step ochraceus strains are to the professional world with recognized micro organism collections free at the disposal. Suitable strains are for example: Aspergillus ochraceus CBS 13,252, ATCC 1008, ATCC 12,337, ATCC 18,500 or NRRL 405.

After terminated hydroxylation the obtained hydroxy compound becomes appropriately not isolated, but the fermentation beginning with 6 to 24 hour old a culture of Arthrobacter simplex or bacillus sphaericus staggered, the which bottom conditions prepared became, which one lies usually to the rearing of bacterial cultures the used breeding temperature within the range of 20 - 400 C, preferably of 25 - 350 C. The aeration becomes preferably 0.5 to 5 liters air per minute per liter Kulturbrühe supplied.

For this second reaction step the *Arthrobacter simplex* or *bacillus sphaericus* strains is available likewise with recognized micro organism collections free.

Suitable strains are for example: *Arthrobacter simplex* IFO (3530), ATCC 13,260 and ATCC 6,946 or *bacillus sphaericus* ATCC 7,054, ATCC 7,055, ATCC 12,488 or ATCC 13,805.

The course of the second Reaktionschritts becomes likewise analytic, for example thin section-chromatographic, followed. The fermentation duration of this step amounts to about 40 to 80 hours.

After made fermentation the fermentation products become in actual known manner isolated. The isolation can take place for the example in the manner that one does not restrict the fermentation beginnings with one with water mixable organic solvents such as ethyl acetate, butyl acetate or methyl isobutyl ketone, extracted, the extracts and the so obtained crude products if necessary by chromatography and/or crystallization cleans.

Preferred starting compounds of the invention process are such the general formula II, which as Sustituenten R a methyl group or an ethyl group inertial.

The subsequent embodiments serve for the explanation of the invention process. These examples describe in addition the use of the compound of the formula I with R in the importance of a methyl group to the synthesis of pharmacological effective substances of the formula III in accordance with claim 2. In the similar manner the remaining compounds of the formula can become I in pharmacological effective substances of the formula III transferred.

#### Example 1 EMI4.1

2 litre Erlenmeyer flasks, which contains 500 ml 30 minutes with 1200C in autoclaves sterilized broth from 1% Corn steep liquor, 1.25 1 Sojabohnenmehl und 0.005 X soya oil, with an oblique tube culture of the strain *aspergillus* is inoculated ochraceus (ATCC 1008) and 21/2 days on a rotary shaker shaken.

With 250 ml this rearing culture 20 a litre before fermenter is inoculated, which is with 15 1 60 minutes of a medium sterilized at 1210C and 1.1 bar overpressure, existing from 1 X Corn steep liquor, 1 X soy bean flour and 0.005 X soya oil, adjusted on pH 6.2, filled. Bottom addition of silicone sports club as antifoams becomes at 290C and 0.7 bar overpressure bottom aeration (15 1/Min.) and agitation (220 UJMin.) 24 hours germiniert.

Afterwards 0.9 liters of this culture bottom sterile conditions removed and thus 50 a litre main fermenter are inoculated, which are with 15 liters sterilized nutrient medium of the same composition as the Vorfermenterkultur charged. After an increasing phase of 12 hours of bottom Vorfermenterbedingungen a sterile-filtered solution of 10,5 g 19-Nortestosteron in 150 ml dimethylformamides becomes added and other agitated and aerated. The course of the fermentation becomes controlled by removal of samples, which become chromatographic analyzed by means of methyl isobutyl ketone extracted and thin section. After a contact time of approx. 60 hours is the hydroxylation complete.

Parallel ones to the hydroxylation become in second Fermenter 15 1 liquid nutrient medium, existing out 1 Z yeast extract, 0.5% Corn steep liquor and 0.05 I strong sugar sterilized, with 250 ml a 2-tägigen *Arthrobacter simplex* - culture (ATCC 6946) inoculates and bottom aeration (15 1/Min.) and agitation (220 rpm.) with 30 °C germiniert. The time of the inoculation is to be selected with the fact in such a way that the culture with completion of the hydroxylation an increasing phase of approx. 18-24 hours more rear itself has. Then becomes the entire bacterial culture in the half substrate fermenter transferred and with the *A. ochraceus* - culture combined. The Bebrütung becomes the bottom conditions continued and aromatizing using specified above now further thin section-chromatographic followed.

After other 60-70 hours contact time ist'auch aromatizing terminated. The culture broth becomes now with the half of their volume and subsequent still twice with 1/3 of the volume at methyl isobutyl ketone extracted, the extracts combined and in the vacuo dry evaporated. To one-to removal of the antifoam 2 hours with hexane agitates the residue, whereby the hexane becomes several times replaced and crystallized finally from acetone over.

One receives 8.2 g 3, Ila Dihydroxy I, to 3 ' 5 (IO) - -17-on of the melting point 267-2690C östratrien.

Use of the procedure product: A. 3-Benzylxy-lla-hydroxy-1,3,5 (10) - östratrien-17-on To a suspension from 4 g 3, Ila-Dihydroxy-1,3,5 (10) - - östratrien-17-on and 19.2 g potassium carbonate in 230 ml

Acetone drips one with room temperature 3.2 ml benzyle bromide in 30 ml acetone and agitates subsequent 5 Stun with 600C. After the cooling one pours in approx. 2 l

Water and extracted with methylene chloride. Kristalli sation the crude product from methanol results in 5.19 g of the title compound of the Schmp. 154-156 C [a] 20 = (CHCl<sub>3</sub>, C = 0.5).

b. 3-Benzylxy-17,17-ethylidendioxy-1,3,5 (10) - east RA trien I la-oil

One heated 5.19 g bottom A. obtained benzyle ether, 5,33 ml ethylene glycol and 126 mg p-toluenesulfonic acid in

200 ml benzene 2 hours at the water separator. After that

One washes cooling with gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung and entire.

Saline and restricts. One receives 5.6 g of the ketal as colorless oil, [a] to D20 = -63.7 (CHCl<sub>3</sub>, C = 0.5).

0 C. 3-Benzylxy-lla-ethoxy-1,3,5 (10) - ostratrien-17-on

To a suspension of 642 mg, cooled on 0 C

Sodium hydride in 30 ml dimethylformamides one drips one

Solution of 900 mg of the bottom b. obtained ketal in and 15 min. agitate 15 ml DMF. after. One adds subsequent ones 2,27 ml Bromethan in addition and agitates 16 hours with 25 C.

Whereupon one pours in ice water and extracted also

Methylene chloride. After restricting one receives 906 mg of a crude product, that without other purification in 20 ml

Dioxan dissolved and after addition of 4 ml 4N-HCl 90 min.

- becomes with 50 C agitated. Subsequent ones one pours in water, extracted with methylene chloride and restricts. After

One receives 780 mg of the titles 20 connection to crystallization from methanol from the Schmp. 132-135 C, [a] D20 = -23 (CHCl<sub>3</sub>, C = 0,5).

3-Benzylxy-lla-methoxy-1,3,5 (10) - östratrien-17-on

One receives analogous ones from 1,2 9 ketal with replacement from ethyl bromide by iodine methane (1.6 ml) 930 mg of the Ila Meth oxy compound from the Schmp. 148-1500C (dilisopropyl ether).

3-Benzylxy-lla-propoxy-I, S, 5 (10) - dstratrien-17-on

With use of I-Brompropan (1.9 ml) one receives 710 mg of the Ila Propoxy compound from 1,1 g of the ketal from the Schmp. 1030C (hexane). r, 720 = 2.10 (CHCl<sub>3</sub>, c=0,5).

D. 11a-Ethoxy-3-hydroxy-1,3,5 (10) - östratrien-17-on

A solution of 650 mg 3-Benzylxy-lla-ethoxy-1,3,5 (10) - - östratrien-17-on in 35 ml ethanol and 35 ml ethyl acetates we & after addition of 650 mg palladium coal (10% Pd)

Space temp. and normal pressure hydrogenated. After uptake of

35 ml H<sub>2</sub> (1.5 h) by the catalyst and concentrated is abtiltliert. Crystallization of the crude

product from hexane results in 503 mg of the title compound of the Schmp. 174-1760C, 20 [a] D20 = -30.6 (CHCl<sub>3</sub>, C = 0.5).

One receives analogous ones: 3-Hydroxy-11a-methoxy-1,3,5 (10) - östratrien-17-on 5 of the Schmp. 208-210 C and  
3-Hydroxy-11 - propoxy-1,3,5 (10) - östratrien-17-on  
20 of the Schmp. 182-183 C (hexane), (aluminium = -31,2 (CHCl<sub>3</sub>, C = 0.5).

e. 17 - Ethinyle - ethoxy-1,3,5 (10) - östratrien-3,17B-diol  
The Ethinylierung that bottom D. obtained 17-Ketone it follows after 22 27 492 Verfanren described in DOS.

In this way one receives: 17a-Ethynyl-11a-ethoxy-1,3,5 (10) - östratrien-3,17ss-diol of the Schmp. 213-2170C (diisopropyl ether), yield 90X, 20 = -140 (CHCl<sub>3</sub>, = (CHCl<sub>3</sub>) 17a-Ethynyl-11c-methoxy-1,3,5 (10) - östratrien-3,17ss-diol, Schmp. 279-281 C, [a] 20 = -147 (CHCl<sub>3</sub>, c=0,5).

D = 17a-Ethynyl-11a-propoxy-1,3,5 (10) - östratrien-3,17B-diol,  
20 [a] D = -131 (CHCl<sub>3</sub>, C = 0.5).

#### Example 2 EM18.1

The bottom conditions of the example 1a to 50 litre fermenters, which contains 15 liters aspergillus ochraceus of a culture, are incubiert 15 g 18-Methyl-19-nor-4-osten-3,17-dion, dissolved in 200 ml DMF, added and 36 hours.

Subsequent one becomes the approach with 15 1 24 hours of a before-cultured Arthrobacter simplex - culture combined and other 63 hours aerobic fermented.

To the isolation of the conversion product extracted one the culture broth with methyl isobutyl ketone, to dry one evaporates the extract, the remote antifoam by washing with hexane and chromatography ore the crude product over a gravel gel column (elution by means of dichloromethane + 12X acetone).

After crystallization from methanol/hexane one receives - östratrien-17-on to 6.3 g 3,11a-Dihydroxy-18-methyl-1,3,5 (10) from the melting point 263-2640C.

[Claims of EP0114984](#)

[Print](#)

[Copy](#)

[Contact Us](#)

[Close](#)

#### Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.



[Claims](#)

1. Method to the production of 3, IIA-Dihydroxy-1,3,5 (10) - Östratrien derivatives of the general formula I

EMI10.1

where R means an alkyl moiety with maximum 4 carbon atoms, characterised in that one a 3-Oxo-4-östren-Derivat of the general formula II

EMI10.2

where R possesses the above importance and X and Y represents a common oxo group or an hydroxy group and a Y represent an hydrogen atom to X, with a culture of aspergillus ochraceus and post.

made hydroxylation with a culture of Arthrobacter simplex or bacillus sphaericus fermented.

2. Use of 3,11a-Dihydroxy-1,3,5 (10) - östratrien

Derivatives of the general formula I according to claim 1 to the production of steroids of the general formula III

EMI11.1

where R and R' an alkyl moiety with maximum 4 carbon atoms mean.

[Claims of EP0114984](#)

[Print](#)

[Copy](#)

[Contact Us](#)

[Close](#)

## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; It is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

### Claims

1. Method to the production of 3, IIA-Dihydroxy-1,3,5 (10) - Östratrien derivatives of the general formula I

EMI10.1

where R means an alkyl moiety with maximum 4 carbon atoms, characterised in that one a 3-Oxo-4-östren-Derivat of the general formula II

EMI10.2

where R possesses the above importance and X and Y represents a common oxo group or an hydroxy group and a Y represent an hydrogen atom to X, with a culture of aspergillus ochraceus and post.

made hydroxylation with a culture of Arthrobacter simplex or bacillus sphaericus fermented.

2. Use of 3,11a-Dihydroxy-1,3,5 (10) - östratrien

Derivatives of the general formula I according to claim 1 to the production of steroids of the general formula III

EMI11.1

where R and R' an alkyl moiety with maximum 4 carbon atoms mean.



⑯

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

㉑ Anmeldenummer: 83112230.4

㉑ Int. Cl. 3: C 12 P 33/10

C 12 P 33/16, C 07 J 1/00

㉒ Anmeldetag: 06.12.83

㉓ Priorität: 23.12.82 DE 3248434

㉔ Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Berlin und Bergkamen  
Müllerstrasse 170/178 Postfach 65 03 11  
D-1000 Berlin 65 (DE)

㉕ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
08.08.84 Patentblatt 84/32

㉖ Erfinder: Petzoldt, Karl, Dr.  
Flachsweg 10  
D-1000 Berlin 38 (DE)

㉗ Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

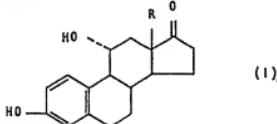
㉘ Erfinder: Neef, Günter, Dr.  
Dorstädter Strasse 9  
D-1000 Berlin 15 (DE)

㉙ Verfahren zur Herstellung von 3,11-alpha-Dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-Derivaten.

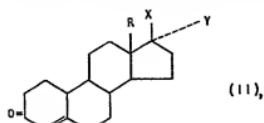
㉚ Es ist ein Verfahren zur Herstellung von 3,11-alpha-Dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-Derivaten der allgemeinen Formel I

Kultur von *Aspergillus ochraceus* und nach erfolgter Hydroxylierung mit einer Kultur von *Arthrobacter simplex* oder *Bacillus sphaericus* fermentiert.

Die Verbindungen der Formel I sind Zwischenprodukte zur Herstellung pharmakologisch wirksamer Steroide.



beschrieben, worin R einen Alkylrest mit maximal 4 Kohlenstoffatomen bedeutet, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein 3-Oxo-4-östren-Derivat der allgemeinen Formel II



woin R die obengenannte Bedeutung besitzt und X und Y gemeinsam eine Oxogruppe darstellen oder X eine Hydroxygruppe und Y ein Wasserstoffatom darstellen, mit einer

EP 0 114 984 A2

Die Erfindung betrifft das in den Patentansprüchen gekennzeichnete Verfahren und die Verwendung der dabei erhaltenen Verfahrensprodukte.

3,11 $\alpha$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-Derivate der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 1 sind wichtige Zwischenprodukte zur Partialsynthese pharmakologisch wirksamer Steroide.

Es ist bekannt, daß Steroide mit aromatischem A-Ring als Substrate für mikrobiologische Umsetzungen wenig geeignet sind (K.Kieslich, Steroid Conversions, in R.H. Rose Microbiol. Bioconversions, Academic Press 1981, 425). Die an 3-Oxo- $\Delta^4$ - oder 3-Hydroxy- $\Delta^5$ -steroiden in hohen Ausbeuten durchführbare 11 $\alpha$ -Hydroxylierung (W. Carney and H.L. Herzog, Microbial Transformations of Steroids, Academic Press 1967) ist auf Östron und Östradiol nicht übertragbar. Überraschenderweise erhält man mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens in hohen Ausbeuten die 11 $\alpha$ -Hydroxyverbindungen des Östradiols und seiner 18-Alkylhomologen.

Der erste Reaktionsschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird unter den Bedingungen durchgeführt, die man üblicherweise bei der mikrobiologischen Hydroxylierung von Steroiden mit Pilzkulturen anwendet. So werden zunächst in allgemein üblichen Vorversuchen die günstigsten Fermentationsbedingungen, wie zum Beispiel Auswahl des günstigsten Nährmediums, des geeigneten Substratlösungs- oder Suspensionsmittels, der Substratkonzentration, der technischen Bedingungen wie Temperatur, Belüftung, pH-Wert und der optimalen Zeiten für Germination, Substratzugabe und Substratkontakt am Enzym des Mikroorganismus analytisch, insbesondere dünn-schichtchromatographisch, ermittelt.

Dabei hat sich gezeigt, daß es zweckmäßig ist, Konzentrationen von etwa 100 - 2 000 mg Substrat pro Liter Nährmedium einzusetzen. Der pH-Wert wird vorzugsweise auf einen Wert im Bereich von 5 - 7 eingestellt. Die Züchtungstemperatur liegt im Bereich von 20 - 40° C, vorzugsweise von 25 - 35° C. Zur Belüftung werden vorzugsweise 0,5 bis 5 Liter Luft pro Minute pro Liter Kulturbrühe zugeführt. Die Umwandlung des Substrates wird zweckmäßigerweise durch dünnenschicht-chromatographische Analyse von Probeextrakten verfolgt. Die Fermentationsdauer beträgt etwa 20 bis 80 Stunden.

Die für diesen ersten Reaktionsschritt benötigten *Aspergillus ochraceus* Stämme stehen der Fachwelt bei anerkannten Mikroorganismen-Sammlungen frei zur Verfügung. Geeignete Stämme sind beispielsweise: *Aspergillus ochraceus* CBS 13 252, ATCC 1008, ATCC 12 337, ATCC 18 500 oder NRRL 405.

Nach beendeter Hydroxylierung wird die erhaltene Hydroxyverbindung zweckmäßigerweise nicht isoliert, sondern der Fermentationsansatz mit einer 6 bis 24 Stunde alten Kultur von *Arthrobacter simplex* oder *Bacillus sphaericus* versetzt, welche unter den Bedingungen hergestellt wurde, die man üblicherweise zur Anzucht von Bakterienkulturen verwendet.

Die Züchtungstemperatur liegt im Bereich von 20 - 40° C, vorzugsweise von 25 - 35° C. Zur Belüftung werden vorzugsweise 0,5 bis 5 Liter Luft pro Minute pro Liter Kulturbrühe zugeführt.

Die für diesen zweiten Reaktionsschritt *Arthrobacter simplex* oder *Bacillus sphaericus* Stämme stehen ebenfalls bei anerkannten Mikroorganismen-Sammlungen frei zur Verfügung. Geeignete Stämme sind beispielsweise: *Arthrobacter simplex* IFO (3530), ATCC 13 260 und ATCC 6 946 oder *Bacillus sphaericus* ATCC 7 054, ATCC 7 055, ATCC 12 488 oder ATCC 13 805.

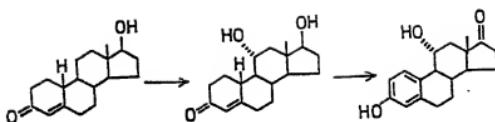
Der Verlauf des zweiten Reaktionschritts wird ebenfalls analytisch, beispielsweise dünnenschichtchromatographisch, verfolgt. Die Fermentationsdauer dieses Schrittes beträgt etwa 40 bis 80 Stunden.

Nach erfolgter Fermentation werden die Fermentationsprodukte in an sich bekannter Weise isoliert. Die Isolierung kann zum Beispiel in der Weise erfolgen, daß man die Fermentationsansätze mit einem nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel wie Äthylacetat, Butylacetat oder Methylisobutylketon, extrahiert, die Extrakte einengt und die so erhaltenen Rohprodukte gegebenenfalls durch Chromatographie und/oder Kristallisation reinigt.

Bevorzugte Ausgangsverbindungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind solche der allgemeinen Formel II, welche als Sustituenten R eine Methylgruppe oder eine Ethylgruppe tragen.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele dienen zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Diese Beispiele erläutern darüberhinaus die Verwendung der Verbindung der Formel I mit R in der Bedeutung einer Methylgruppe zur Synthese von pharmakologisch wirksamen Substanzen der Formel III gemäß Patentanspruch 2. In der gleichen Weise können die übrigen Verbindungen der Formel I in pharmakologisch wirksame Substanzen der Formel III überführt werden.

Beispiel 1



Ein 2 Liter-Erlenmeyerkolben, der 500 ml einer 30 Minuten bei 120°C im Autoklaven sterilisierten Nährlösung aus 1% Corn steep liquor, 1,25% Sojabohnenmehl und 0,005% Sojaöl enthält, wird mit einer Schrägröhrchen-Kultur des Stammes *Aspergillus ochraceus* (ATCC 1008) beimpft und 2 1/2 Tage auf einem Rotationsschüttler geschüttelt.

Mit 250 ml dieser Anzuchtkultur wird ein 20 Liter-Vorfermenter beimpft, der mit 15 l eines 60 Minuten bei 121°C und 1,1 bar Überdruck sterilisierten Mediums, bestehend aus 1% Corn steep liquor, 1% Sojabohnenmehl und 0,005% Sojaöl, eingestellt auf pH 6,2, gefüllt ist. Unter Zugabe von Silicon SH als Antischäummittel wird bei 29°C und 0,7 bar Überdruck unter Belüftung (15 l/Min.) und Röhren (220 U/Min.) 24 Stunden germiniert.

Danach werden 0,9 Liter dieser Kultur unter sterilen Bedingungen entnommen und damit ein 50 Liter-Hauptfermenter beimpft, der mit 15 Liter sterilisiertem Nährmedium der gleichen Zusammensetzung wie die Vorfermenterkultur beschickt ist. Nach einer Anwachphase von 12 Stunden unter Vorfermenterbedingungen wird eine sterilfiltrierte Lösung von 10,5 g 19-Nortestosteron in 150 ml Dimethylformamid hinzugegeben und weiter gerührt und belüftet. Der Verlauf der Fermentation wird durch Entnahme von Proben kontrolliert, die mittels Methylisobutylketon extrahiert und dünnenschichtchromatographisch analysiert werden. Nach einer Kontaktzeit von ca. 60 Stunden ist die Hydroxylierung vollständig.

Parallel zur Hydroxylierung werden in einem zweiten Fermenter 15 l flüssiges Nährmedium, bestehend aus 1% Hefeextrakt, 0,5% Corn steep liquor und 0,05% Stärkezucker sterilisiert, mit 250 ml einer 2-tägigen *Arthrobacter simplex* - Kultur (ATCC 6946) beimpft und unter Belüftung (15 l/Min.) und Röhren (220 U/Min.) bei 30°C germiniert. Der Zeitpunkt der Beimpfung ist dabei so zu wählen, daß die Kultur bei Beendigung der Hydroxylierung eine Anwachphase von ca. 18-24 Stunden hinter sich hat. Sodann wird die gesamte Bakterien-Kultur in den halbgefüllten Substratfermenter überführt und mit der *A. ochraceus* - Kultur vereinigt. Die Bebrütung wird unter den oben genannten Bedingungen fortgesetzt und die nun einsetzende Aromatisierung weiterhin dünnenschicht-chromatographisch verfolgt.

Nach weiteren 60-70 Stunden Kontaktzeit ist auch die Aromatisierung beendet. Die Kulturbrei wird nun mit der Hälfte ihres Volumens und anschließend noch zweimal mit 1/3 des Volumens an Methylisobutylketon extrahiert, die Extrakte vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Den Rückstand röhrt man zur Entfernung des Antischäummittels 2 Stunden mit Hexan, wobei das Hexan mehrmals ersetzt wird und kristallisiert schließlich aus Aceton um.

Man erhält 8,2 g 3,11 $\alpha$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-Östratrien-17-on vom Schmelzpunkt 267-269°C.

#### Verwendung des Verfahrensprodukts:

##### a. 3-Benzylxy-11 $\alpha$ -hydroxy-1,3,5(10)-Östratrien-17-on

Zu einer Suspension aus 4 g 3,11 $\alpha$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-Östratrien-17-on und 19,2 g Kaliumcarbonat in 230 ml Aceton tropft man bei Raumtemperatur 3,2 ml Benzyl-

bromid in 30 ml Aceton und röhrt anschließend 5 Stunden bei 60°C. Nach dem Abkühlen gießt man in ca. 2 l Wasser und extrahiert mit Methylchlorid. Kristallisation des Rohprodukts aus Methanol ergibt 5,19 g der Titelverbindung vom Schmp. 154-156°C,  $[\alpha]_D^{20} = -9,5^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0,5$ ).

b. 3-Benzylxy-17,17-ethylidendioxy-1,3,5(10)-östratrien-11 $\alpha$ -ol

Man erhitzt 5,19 g des unter a. erhaltenen Benzyläthers, 5,33 ml Ethylenglykol und 126 mg p-Toluolsulfonsäure in 200 ml Benzol 2 Stunden am Wasserabscheider. Nach dem Abkühlen wäscht man mit gesätt.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und gesätt. Kochsalzlösung und engt ein. Man erhält 5,6 g des Ketals als farbloses Öl,  $[\alpha]_D^{20} = -63,7$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0,5$ ).

c. 3-Benzylxy-11 $\alpha$ -ethoxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on

Zu einer auf 0°C gekühlten Suspension von 642 mg Natriumhydrid in 30 ml Dimethylformamid tropft man eine Lösung von 900 mg des unter b. erhaltenen Ketals in 15 ml DMF und röhrt 15 Min. nach. Anschließend fügt man 2,27 ml Bromethan hinzu und röhrt 16 Stunden bei 25°C. Darauf gießt man in Eiswasser und extrahiert mit Methylchlorid. Nach dem Einengen erhält man 906 mg eines Rohprodukts, das ohne weiterer Reinigung in 20 ml Dioxan gelöst und nach Zusatz von 4 ml 4N-HCl 90 Min. bei 50°C gerührt wird. Anschließend gießt man in Wasser, extrahiert mit Methylchlorid und engt ein. Nach Kristallisation aus Methanol erhält man 780 mg der Titelverbindung vom Schmp. 132-135°C,  $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0,5$ ).

3-Benzylxy-11 $\alpha$ -methoxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on

Analog erhält man aus 1,2 g Ketal bei Ersatz von Ethylbromid durch Jodmethan (1,6 ml) 930 mg der 11 $\alpha$ -Methoxy-Verbindung vom Schmp. 148-150°C (Diisopropylether).

3-Benzylxy-11 $\alpha$ -propoxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on

Bei Verwendung von 1-Brompropan (1,9 ml) erhält man aus 1,1 g des Ketals 710 mg der 11 $\alpha$ -Propoxy-Verbindung vom Schmp. 103°C (Hexan).  $[\alpha]_D^{20} = -22,1^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0,5$ ).

d. 11 $\alpha$ -Ethoxy-3-hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on

Eine Lösung von 650 mg 3-Benzylxy-11 $\alpha$ -ethoxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on in 35 ml Ethanol und 35 ml Essigester wird nach Zusatz von 650 mg Palladiumkohle (10% Pd) bei Raumtemp. und Normaldruck hydriert. Nach Aufnahme von 35 ml  $\text{H}_2$  (1,5 h) wird vom Katalysator abfiltriert und eingeeengt. Kristallisation des Rohprodukts aus Hexan ergibt 503 mg der Titelverbindung vom Schmp. 174-176°C.  $[\alpha]_D^{20} = -30,6^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0,5$ ).

Analog erhält man:

3-Hydroxy-11 $\alpha$ -methoxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on  
vom Schmp. 208-210°C und

3-Hydroxy-11 $\alpha$ -propoxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on  
vom Schmp. 182-183°C (Hexan),  $[\alpha]_D^{20} = -31,2^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0,5$ ).

e. 17 $\alpha$ -Ethiny-11 $\alpha$ -ethoxy-1,3,5(10)-östratrien-3,17B-diol

Die Ethinylierung der unter d. erhaltenen 17-Ketone er-

folgt nach dem in DOS 22 27 492 beschriebenen Verfahren.

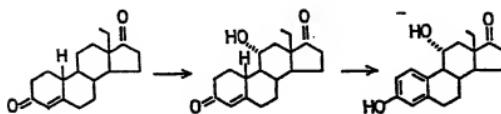
Auf diese Weise erhält man:

17 $\alpha$ -Ethynyl-11 $\alpha$ -ethoxy-1,3,5(10)-östratrien-3,17 $\beta$ -diol  
vom Schmp. 213-217°C (Diisopropylether), Ausbeute 90%,  
 $[\alpha]_D^{20} = -140^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0,5).

17 $\alpha$ -Ethynyl-11 $\alpha$ -methoxy-1,3,5(10)-östratrien-3,17 $\beta$ -diol,  
Schmp. 279-281°C,  $[\alpha]_D^{20} = -147^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0,5).

17 $\alpha$ -Ethynyl-11 $\alpha$ -propxoxy-1,3,5(10)-östratrien-3,17 $\beta$ -diol,  
 $[\alpha]_D^{20} = -131^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 0,5).

Beispiel 2

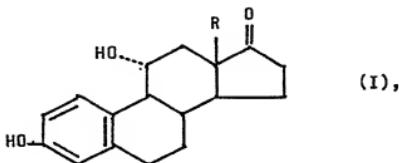


Unter den Bedingungen des Beispiels 1a werden zu einem 50 Liter-Fermenter, der 15 Liter einer *Aspergillus ochraceus*-Kultur enthält, 15 g 18-Methyl-19-nor-4-östren-3,17-dion, gelöst in 200 ml DMF, zugegeben und 36 Stunden incubiert. Anschließend wird der Ansatz mit 15 l einer 24 Stunden vor-kultivierten *Arthrobacter simplex* - Kultur vereinigt und weitere 63 Stunden aerob fermentiert. Zur Isolierung des Umwandlungsprodukts extrahiert man die Kulturbrühe mit Methylisobutylketon, dampft den Extrakt zur Trockne ein, entfernt das Antischäummittel durch Waschen mit Hexan und chromatographiert das Rohprodukt über eine

Kieselgelsäule (Elution mittels Dichlormethan + 12% Aceton).  
Nach Kristallisation aus Methanol/Hexan erhält man 6,3 g  
3,11 $\alpha$ -Dihydroxy-18-methyl-1,3,5(10)-östratrien-17-on  
vom Schmelzpunkt 263-264°C.

Patentansprüche

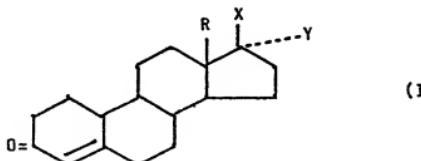
1. Verfahren zur Herstellung von 3,11a-Dihydroxy-1,3,5(10)-Östratrien-Derivaten der allgemeinen Formel I



(I),

worin

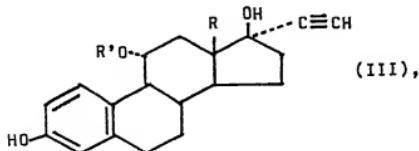
R einen Alkylrest mit maximal 4 Kohlenstoffatomen bedeutet, dadurch gekennzeichnet, daß man ein 3-Oxo-4-Östren-Derivat der allgemeinen Formel II



(II),

worin R die obengenannte Bedeutung besitzt und X und Y gemeinsam eine Oxogruppe darstellen oder X eine Hydroxygruppe und Y ein Wasserstoffatom darstellen, mit einer Kultur von Aspergillus ochraceus und nach erfolgter Hydroxylierung mit einer Kultur von Arthrobacter simplex oder Bacillus sphaericus fermentiert.

2. Verwendung von 3,11 $\alpha$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-Derivaten der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Steroiden der allgemeinen Formel III



worin R und R' einen Alkylrest mit maximal 4 Kohlenstoffatomen bedeuten.